# 鸡 OV 启动子表达 HA 对禽流感病毒攻击提供完全保护

李亚芳[1,2] 赵颖慧[2] 刘赛宝[1,2] 王伟[2] 曾为俊[1,2] 王金泉[1*] 陈洪岩[2*] 孟庆文[2*]

（1 新疆农业大学动物医学学院 新疆乌鲁木齐 830000 2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150069）

**摘要** 鸡卵清蛋白（Ovalbumin，OV）基因 5’调控序列是构建鸡输卵管生物反应器的首选调控元件。以 EGFP 为报告基因，构建 OV 启动子真核表达载体，转染原代输卵管上皮细胞和 CHO 细胞，筛选得到 1.1kb 的高效 OV 启动子。构建 1.1kb OV 启动子表达 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 蛋白真核表达载体 $pOV_{1.1k}$-HA，转染 CHO 细胞。PCR、RT-PCR 鉴定结果证明 HA 基因整合至 CHO 细胞基因组，并进行转录；SDS-PAGE、Western blot 及 HA 试验结果证明 HA 蛋白在 CHO 细胞内的表达，并具有免疫反应性和血凝活性。以纯化的 HA 蛋白免疫 4 周龄 SPF 鸡，2 周后加强免疫一次，加强免疫 3 周 HI 抗体水平为 6.3log2；以 $10^6$ $EID_{50}$ H5N1(A/Goose/Guangdong/1/96)亚型禽流感病毒鼻腔接种 SPF 鸡，免疫组 100%存活，无排毒现象，对照组 100%死亡。结果表明：筛选的 1.1kb OV 启动子可有效驱动 HA 蛋白表达，表达的 HA 蛋白免疫 SPF 鸡对禽流感病毒攻击提供完全保护；为鸡输卵管生物反应器表达保护性抗原和珍贵药物蛋白奠定了基础。

**关键词** 鸡卵清蛋白启动子 HA 禽流感病毒 免疫保护 输卵管生物反应器

# Chicken OV promoter expressed HA to protect chickens from lethal challenge of AIV

LI Ya-fang[1,2] ZHAO Ying-hui[2] LIU Sai-bao[1,2] WANG Wei[2] ZENG Wei-jun[1,2] WANG Jin-quan[1*] CHEN Hong-yan[2*] MENG Qing-wen[2*]

（1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2 State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology，Heilongjiang provincial Key Laboratory of Laboratory Animals and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences，Harbin, Heilongjiang 150069, China)

**Abstract** The 5’ regulation sequence of the chicken ovalbumin (Ovalbumin, OV) gene is the preferred regulatory element for the development of poultry oviduct bioreactor. Using EGFP as reporter gene， the eukaryotic expression vector containing the OV promoter is constructed and effective promoter is screened by analyzing the expression of GFP in the primary cell cultures of chicken oviduct and CHO cell, OV promoter of 1.1kb is identified which is used for further experiments. A recombinant vector named $pOV_{1.1k}$-HA to express HA protein of H5N1 subtype

influenza virus is constructed. It is subsequently transfected into CHO cells, PCR and RT-PCR analysis of HA gene suggested that the vector could be delivered into CHO cells and then get them transcribed. The immunoreactivity and hemagglutination activity of HA protein are determined by Western blot and HA test. The 4-week-old SPF chickens are vaccinated with purified HA protein and boosts were conducted with the same dosage after two weeks. The HI antibody level is 6.3log2 of three weeks after the boost. All chickens are challenged with $10^6$ $EID_{50}$ of H5N1 virus ((A/Goose/Guangdong/1/96). The survival rate of all vaccinated chickens is 100% and that of control group is 0, also no detoxification in the vaccine group. It is indicated that complete protection is provided. Results show that the screened 1.1kb OV promoter could effectively drive the expression of HA protein and the expression of HA protein immunizing SPF chicken provided complete protection against avian influenza virus attack. The basis for the expression of protective antigens and precious drug proteins in the chicken oviduct bioreactor will be founded.

**Key words** chicken ovalbumin promoter HA avian influenza virus immune protection oviduct bioreactor



与哺乳动物相比，转基因鸡作为生物反应器因其世代间隔短、饲养成本低、蛋白产量和糖基化程度高等卓越的优势成为生物科学领域研究的热点之一，被认为是一种极具吸引力的蛋白生产系统[1]。2015 年，FDA 批准从转基因鸡蛋中获得用于治疗溶酶体酸脂酶缺乏（LAL-D）症的药物 Kanuma 上市，使转基因鸡继转基因山羊和转基因兔之后也加入了制药队伍[2]。

卵清蛋白在蛋清中含量最多，是输卵管上皮细胞分泌的主要蛋白，以输卵管定位表达为目标的基因导入研究，绝大部分采用了卵清蛋白基因的调控序列。因此，对卵清蛋白基因表达调控元件，特别是启动子领域的研究和优化，是国际性的研究热点。Sanders 等[3,4]研究发现在卵清蛋白调控序列中，上游调控区 1 kb 以内的序列足以驱动目的基因在输卵管内定位表达。杨鹏翔等[5]的研究中，采用卵清蛋白基因 5’端 1.25 kb 调控序列构建的表达载体却未能成功实现组织特异性表

基金项目：兽医生物技术国家重点实验室自主课题（SKLVBP2017010）；国家自然基金项目（30771615）；“十二五”农村领域国家科技计划课题（2011AA100305）

*通讯作者： 王金泉，E-mail：wangjinquan163@163.com

陈洪岩，E-mail：chenhongyan@caas.cn

孟庆文，E-mail：mqw@hvri.ac.cn

达。Oishi 等[6]采用卵清蛋白基因 5'端 2.8kb 调控序列，利用 Cre-loxP 条件性基因诱导系统提高了单克隆抗体的组织特异性表达水平。这些研究表明，启动子上游和近端区域对输卵管特异性表达卵清蛋白有调控作用。然而，具体的调控机制，包括每个区域的详细功能，对于构建鸡输卵管特异表达载体所需的 OV 调控元件等尚未阐明[7]。

H5N1 亚型高致病性禽流感不仅严重危害养殖业的发展，而且病原变异突破种间屏障，导致包括人类在内的多种哺乳动物的感染与死亡，对人类公共卫生造成重大威胁。目前疫苗免疫仍然是预防禽流感大流行的最有效途径，现有的传统全病毒灭活苗依赖鸡胚进行生产，耗时长，难以满足需求，且灭活苗的使用会影响对禽流感的血清学监测和流行病学调查[8]。因此研制高效、安全、实用的禽流感疫苗迫在眉睫[9]。血凝素（HA）蛋白是禽流感中最重要的保护性抗原，具有较强的免疫原性，基于 HA 蛋白的基因工程疫苗具有良好的免疫效力。本研究构建 1.1kb OV 启动子表达 H5N1 亚型流感病毒血凝素 HA 蛋白的真核表达载体，在 CHO 细胞中表达，表达的 HA 蛋白具有生物学活性，免疫 SPF 鸡对禽流感病毒攻击提供完全保护。有望为鸡输卵管生物反应器生产新型基因工程亚单位疫苗以及珍贵药物蛋白提供新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒与毒株 pcDNA6.2-GFP 为本实验室保存；鹅源 AIV A/Goose/Guang dong 1/96（H5N1）株由农业部动物流感中心保存。

1.1.2 主要试剂 无内毒素质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司；总蛋白抽提试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司；工具酶购自 NEB 公司；PolyJet DNA In Vitro Transfection Reagent 购自 SignaGen 公司；雌二醇、皮质酮、胰岛素购自 sigma 公司；DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司；抗体购自 li-cor 公司和北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 实验动物与细胞 CHO 细胞为本实验室保存；4 周龄 SPF 鸡及 9-11 日龄 SPF 鸡胚购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心，SPF 鸡在负压隔离器内饲养；病毒感染试验在生物安全 3 级实验室（ABSL-3）内进行。

### 1.2 表达载体的构建

以海兰白鸡基因组为模板，通过 PCR 方法扩增 1.1kb、2.7kb、3.0kb 的卵清蛋白启动子区，置换 pcDNA6.2-GFP 中的 CMV 启动子序列，构建真核表达载体 $pOV_{1.1k}$-GFP、$pOV_{2.7k}$-GFP、$pOV_{3.0k}$-GFP。

根据 GenBank 中报道的 H5N1 基因序列设计引物扩增 HA 基因，上游引物为 5'-CGAGCTCGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTT-3'；下游引物为 5'-CCGCTCGAGCGGTTAAATGCAAATTCTGCACTG-3'。PCR 扩增目的基因 HA，经测序鉴定后，连接至去除 GFP 序列的 $pOV_{1.1k}$-GFP 质粒中，连接产物转化 DH5α，挑取单克隆，提取质粒进行酶切和测序鉴定。

### 1.3 卵清蛋白基因启动子的筛选

1.3.1 原代输卵管上皮细胞的培养与转染 按照参考文献[10]的方法制备原代输卵管上皮细胞，经差速贴壁纯化后悬浮于含 20%胎牛血清、1%双抗、雌二醇、皮质酮和胰岛素终浓度分别为 0.1μmol/L, 1μmol/L 和 50μg/L 的 DMEM/F12 培养液中。将培养 4~5d 的原代输卵管上皮调整细胞密度以 $5\times10^5$/孔接种 6 孔细胞培养板，于 37℃ $CO_2$ 培养箱内进行培养至 70%~80%汇合度。按 PolyJet DNA In Vitro Transfection Reagent 说明书操作，将含有 GFP 报告基因的重组质粒按转染输卵管上皮细胞，以 pcDNA6.2-GFP 质粒作为阳性对照。在 $CO_2$ 培养箱中培养 48 h，使用荧光显微镜观察 GFP 表达，通过流式细胞仪分析各组阳性率及平均荧光荧光强度。

1.3.2 CHO 细胞的培养与转染 CHO 细胞以 $1\times10^5$/孔接种 24 孔板，以含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37℃ $CO_2$ 培养箱中培养至 60%~70%汇合度，转染重组质粒，以 pcDNA6.2 质粒作为阳性对照。培养 48 h，观察 GFP 的表达，通过流式细胞仪分析各组阳性率及平均荧光荧光强度。

### 1.4 HA 基因的表达

1.4.1 PCR、RT-PCR 分析 $pOV_{1.1k}$-HA 按照 1.2.2 方法转染 CHO 细胞，于 37℃ $CO_2$ 培养箱中培养 48h，收集细胞提取 DNA、RNA，进行 PCR、RT-PCR 分析。

1.4.2 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析 $pOV_{1.1k}$-HA 转染 CHO 细胞 48h，收集细胞裂解后进行 12% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色，经脱色液脱色后观察结果。将完成 12% SDS-PAGE 电泳的凝胶转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭 2h，以鸡 H5N1 全病毒抗血清（1：500）、兔抗 GAPDH（1：5000）为一抗，红外荧光标记的驴抗鸡 IgG（1：5000）、HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗（1：5000），做 Western Blot 分析，通过 Odyssey 软件对结果分析。

1.4.3 HA 蛋白定量和纯化 $pOV_{1.1k}$-HA 转染 CHO 细胞后，用含终浓度为 11mg/L 杀稻瘟菌素(Blasticidin)的完全培养基加压筛选，2 代后收集细胞裂解，产物经紫外分光光度计定量，SDS-PAGE 凝胶考马斯亮蓝染色后，对各条带灰度值进行分析，以确定 HA 蛋白占细胞总蛋白的百分比；通过切胶纯化的方法，收集含 HA 蛋白的 SDS-PAGE 胶，研磨碎后加入适量 PBS 后震荡混匀备用。

1.4.4 血凝试验 分别取 25μl PBS 和 25μl 蛋白样品加入到 96 孔微量血凝板中，对抗原进行倍比稀释，并向每孔加入 25μl 1%鸡红细胞，作用 15-20 min，观察并记录结果。

1.4.5 动物试验 8 只 4 周龄 SPF 鸡分为两组，每组 4 只，将切下的胶研磨碎后加入适量 PBS 混匀，胸部肌肉免疫 10μg HA 蛋白/羽，阴性对照组注射 PBS。免疫 2 周后以同等剂量加强免疫一次，加强免疫 3 周翅静脉采血、分离血清，按照 0IE 标准 HI 方法进行血凝抑制试验；之后以 $10^6EID_{50}$ H5N1 (A/Goose/Guangdong/1/96) 亚型禽流感病毒通过滴鼻的方式攻毒，攻毒后连续两周每天观察鸡的临床状态及死亡情况；分别于攻毒后第 3、6 天采集喉头拭子和泄殖腔拭子（死亡鸡只随时采集），置于 1ml 含双抗(1000U/mL 的青霉素和 1000μg/mL 的链霉素)的 PBS 中，离心后取 200μl 上清接种 9~11 日龄鸡胚，孵育 48h 后收集尿囊液，检测其血凝活性。

## 2 结果

### 2.1 原代输卵管上皮细胞转染结果

$pOV_{1.1k}$-GFP、$pOV_{2.7k}$-GFP、$pOV_{3.0k}$-GFP 和对照质粒 pcDNA6.2-GFP 转染原代输卵管上皮细胞，36h 后各转染组细胞均检测到荧光表达，48h 阳性率及平均荧光强度均有所增加[见图 1]。pcDNA6.2-GFP 转染组荧光表达量和平均荧光强度明显高于卵清蛋白启动子表达载体组，卵清蛋白启动子表达载体 $pOV_{1.1k}$-GFP 荧光表达量和平均荧光强度均高于 $pOV_{2.7k}$-GFP，$pOV_{3.0k}$-GFP 组，但差异不显著[见图 2(a)、(b)]。

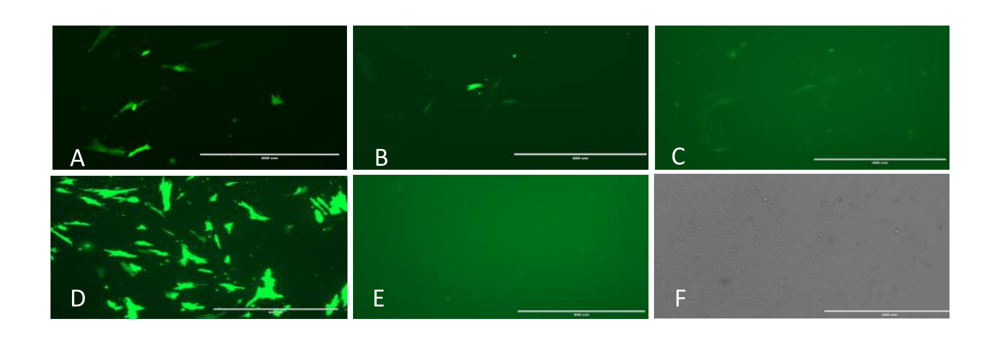
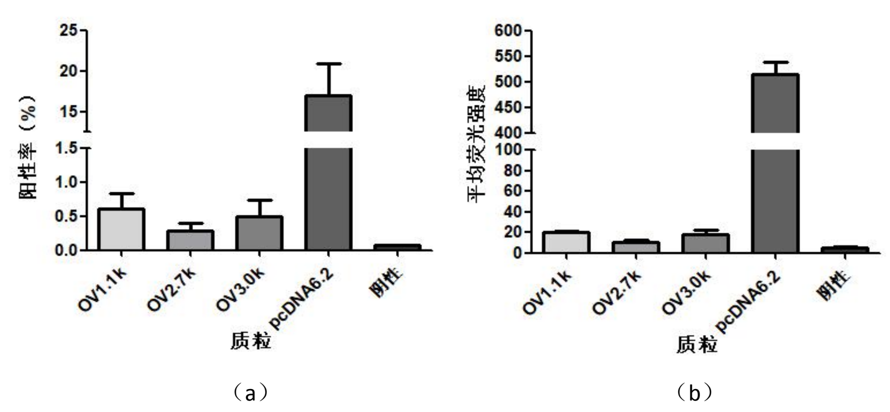



**图 1. $pOV_{1.1k}$-GFP、$pOV_{2.7k}$-GFP、$pOV_{3.0k}$-GFP、pcDNA6.2-GFP 在原代输卵管上皮细胞中的表达（10X）**

**Fig 1. Expression of recombinant vector in the primary cells of chicken oviduct**

A:$pOV_{1.1k}$-GFP; B:$pOV_{2.7k}$-GFP; C:$pOV_{3.0k}$-GFP; D:pcDNA6.2-GFP; E:Negative control; F:bright field modality




（a） （b）

图 2. 转染原代输卵管上皮 48h 后各转染组阳性率（a）和平均荧光强度（b）

**Fig2.GFP assays in transfected primary cell of chicken oviduct by Flow cytometry**

GFP was measured as positive rate and fluorescence intensity. The data are means±SD of 3 independent assays.

## 2.2 CHO 细胞转染结果

pOV$_{1.1k}$-GFP、pOV$_{2.7k}$-GFP、pOV$_{3.0k}$-GFP 和对照质粒 pcDNA6.2-GFP 转染 CHO 细胞，24h 后各转染组细胞均检测到荧光表达，随着时间延长，荧光表达量增多，48h 达到最高 [见图 3]。pcDNA6.2-GFP 转染组荧光表达量和平均荧光强度明显高于卵清蛋白启动子表达载体组，卵清蛋白启动子表达载体 pOV$_{1.1k}$-GFP 荧光表达量和平均荧光强度显著高于 pOV$_{2.7k}$-GFP，pOV$_{3.0k}$-GFP 组 [见图 4(a)、(b)]。

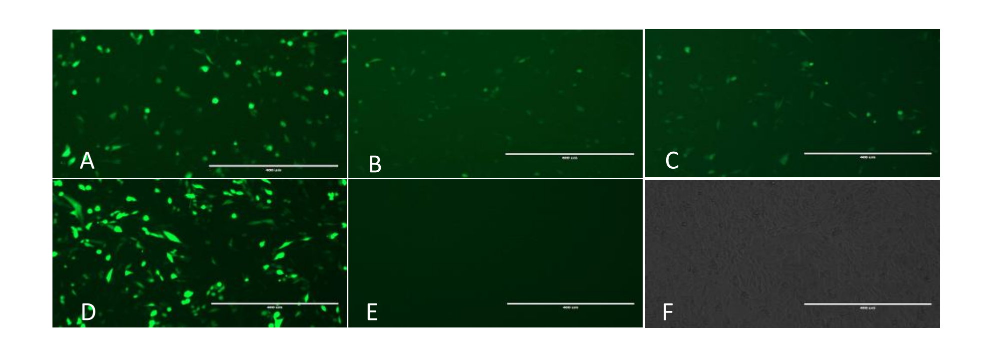
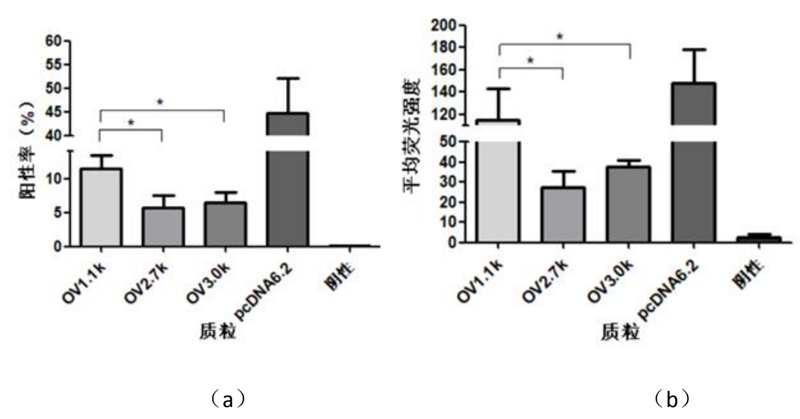



**图 3. pOV$_{1.1k}$-GFP、pOV$_{2.7k}$-GFP、pOV$_{3.0k}$-GFP、pcDNA6.2-GFP 质粒在 CHO 细胞内表达（10X）**

**Fig3.Expression of recombinant vector in CHO cells**

A:pOV$_{1.1k}$-GFP; B:pOV$_{2.7k}$-GFP; C:pOV$_{3.0k}$-GFP; D:pcDNA6.2-GFP;

E: Negative control; F:brightfield modality




（a）　　　　　　　　（b）

图 4. 转染 CHO 细胞 48h 后各转染组阳性率（a）和平均荧光强度（b）

**Fig4.GFP assays in transfected CHO cells by Flow cytometry**

GFP was measured as positive rate and fluorescence intensity. The data are means±SD of 3 independent assays（*$P<0.05$）.

## 2.3 表达载体的构建及在 CHO 细胞中表达

2.3.1 载体构建　扩增得到的 HA 序列经测序分析后与 GenBank 中 H5N1(A/Goose/Guangdong/1/96)的序列一致，对重组质粒酶切鉴定[见图 5]，将鉴定正确的质粒命名为 $pOV_{1.1k}$-HA。

2.3.2 PCR、RT-PCR 结果　$pOV_{1.1k}$-HA 转染 CHO 细胞后 48 h，经 PCR、RT-PCR 分析均检测到 1700bp 左右的 HA 条带[见图 6(a)、(b)]。

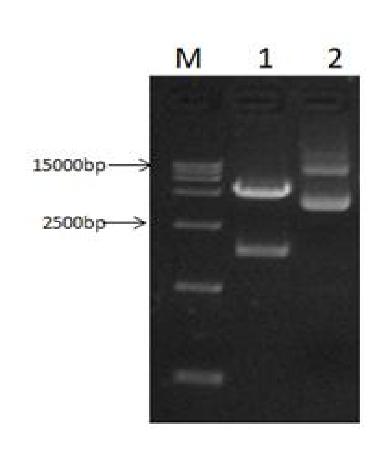



图 5. 重组质粒酶切鉴定

**Fig 5. Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion.**

M：DL15000；1：$pOV_{1.1k}$-HA of enzyme digestion；2：$pOV_{1.1k}$-HA

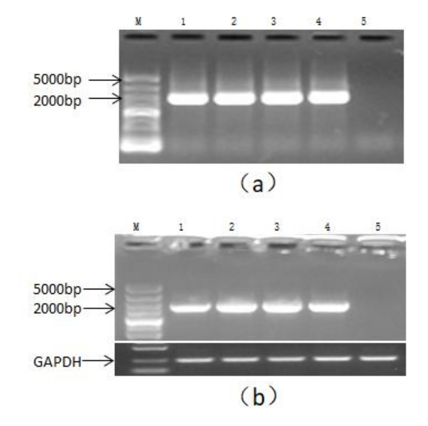



图 6. 转染 CHO 细胞 HA 基因 PCR（a）RT-PCR（b）结果

**Fig 6. PCR 、RT-PCR analysis of CHO cell**

M: DL5000；1-2: pOV1.1k-HA；

3-4：pOV1.1k-HA（screening by Blasticidin）；

5: Negative control；GAPDH：GAPDH was used as internal

2.3.3 SDS-PAGE 与 Western blot 分析 HA 蛋白表达　$pOV_{1.1k}$-HA 质粒转染 CHO 细胞 48h 后，转染组细胞裂解物经 SDS-PAGE 电泳检测到 HA 蛋白表达，与预期大小

一致[见图 7(a)]；Western-blot 分析结果表明表达的 HA 蛋白具有免疫反应性[见图 7(b)]。

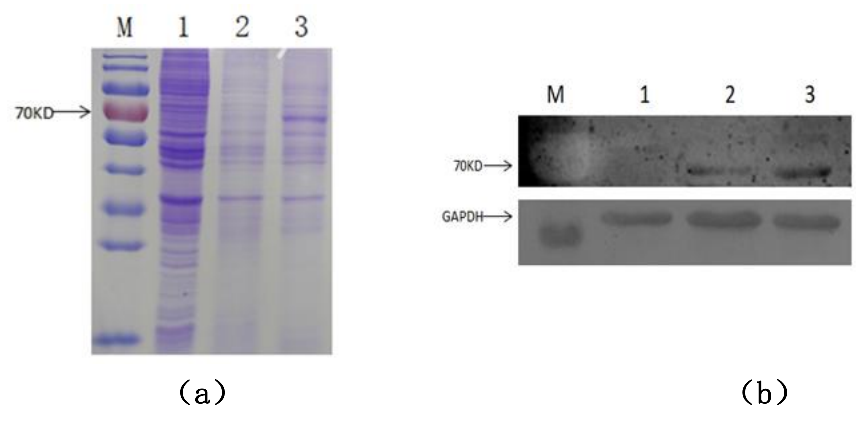



图 7. SDS-PAGE（a）及 Western-blot（b）分析 HA 蛋白表达

**Fig 7. Analysis of HA protein expressed in CHO by SDS-PAGE Western-blot**

M：Standard quality of protein molecules；1：Untransfected CHO cell；2：pOV1.1k-HA transfected CHO cell；3：pOV1.1k-HA transfected CHO cell（screening by Blasticidin）

### 2.4 血凝试验结果

pOV$_{1.1k}$-HA 转染 CHO 细胞后，经 Blasticidin 加压筛选 2 代后收集细胞裂解后收集蛋白，表达产物经紫外分光光度计定量，SDS-PAGE 凝胶考马斯亮蓝染色后，对各条带灰度值进行分析，结果表明 HA 蛋白占细胞蛋白总量的 23%。血凝试验结果表明重组 HA 蛋白的血凝效价达 $2^4$。

### 2.5 HA 蛋白的免疫保护性试验结果

2.5.1 血凝抑制抗体效价检测 血凝抑制试验结果表明，HA 蛋白免疫组加强免疫 3 周后 HI 抗体效价为 6.3log2，PBS 组无 HI 抗体 [见表 1]。

2.5.2 临床观察、病毒分离、死亡率 以 $10^6$ $EID_{50}$ 的剂量通过鼻腔接种 SPF 鸡，HA 蛋白免疫组未表现任何临床症状，喉拭子和泄殖腔拭子均未分离到病毒，在观察的 2 周内全部存活。PBS 组 SPF 鸡表现出精神沉郁、食欲废绝等明显的临床症状，喉拭子和泄殖腔拭子均分离到病毒，且在 6 天内全部死亡[见表 1]。

表 1 加强免疫 3 周后 HI 抗体水平及攻毒保护分析

Table 1 HI antibody level after 3 weeks of the boost and HA protect SPF Chicken against lethal challenge

| 组别 | HI 抗体（log2） | 攻毒后排毒情况（$lgEID_{50}$） | | | | 存活/总数 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DPI=3 | | DPI=6 | | |
| | | 喉拭子 | 泄殖腔拭子 | 喉拭子 | 泄殖腔拭子 | |
| HA 蛋白组 | 6.3±0.96 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 |
| PBS 组 | — | 4/4 | 4/4 | / | / | 0/4 |

注：“—”代表未检测到抗体；Note：“—”Means without any antibody antibody

“/”代表 对照组在攻毒 6 天内全部死亡；“/” Means all of animals died

## 3 讨论

20 世纪 80 年代，卵清蛋白基因 5’调控序列作为基因表达调控的模型得到深入而广泛的研究，其内含子，外显子以及特异表达的顺式调控元件和反式作用因子的研究已十分明确[11]。鸡卵清蛋白基因的第 1 外显子、第 1 内含子以及第 2 外显子的部分序列都位于起始密码子 ATG 上游，不编码蛋白，这段序列对卵清蛋白基因的表达调控的影响尚未阐明。有研究表明，某些基因的内含子，特别是第一内含子可以显著提高外源基因的表达[12]。房浩霞等[13]的研究表明，鸡卵清蛋白基因第一内含子和 3’调控区对目的基因在鸡输卵管细胞中的表达具有正调节作用。黄菁等[14]进一步研究发现 OV 基因第一内含子的+678~+1008bp 位置存在对转录活性有增强作用的区域，而在+1298~+1628bp 位置存在对转录活性有抑制作用的区域。本研究选用的 1.1kb 卵清蛋白启动子，包含卵清蛋白启动子驱动外源基因表达所必需的 TATATAT 框和类固醇依赖的正调控序列（SDRE）及其下游的负调控序列（NRE），2.7kb 和 3.0kb 的卵清蛋白启动子除包含上述调控元件外均包含第一内含子序列[15]。结果表明 2.7kb 和 3.0kb 的卵清蛋白启动子表达效率均低于 1.1kb 卵清蛋白启动子，可能是由于第一内含子中包含抑制卵清蛋白基转录活性的区域。本研究克隆了不同长度卵清蛋白基因 5’调控序列，旨在优化上游调控方案，提高卵清蛋白启动子的表达效率。

鸡输卵管上皮细胞在每日循环中产生大量的卵清蛋白，且表达调控受到激素的诱导，是研究卵清蛋白蛋白基因调控元件的理想细胞。本研究培养了原代输卵管上皮细胞，转染重组质粒后能够检测到 HA 蛋白的表达（数据未显示），但是原代输卵管上皮细胞生长缓慢，体外生长条件要求苛刻，质粒 DNA 的转染效率低[16]。CHO 细胞来源于中国仓鼠卵巢细胞系，形态学属于上皮细胞，体外培养容易，与输卵管上皮细胞相似都具有分泌特性[17]，因此常作为鸡原代输卵管上皮细胞的替代细胞研究卵清蛋白启动子特性。逄越[18]等研究表明采用 CHO 细胞进行 OV 启

动子功能分析可以在很大程度上缩短实验时间，对研究启动子的功能有很好的补充作用。

HA 蛋白是禽流感病毒中最重要的保护性抗原，具有较强的免疫原性，它不仅可诱导机体产生保护性抗体，而且可刺激机体产生细胞免疫应答，对同一亚型病毒的攻击产生良好的保护力。本实验室 Liu 等[8]利用昆虫细胞杆状病毒表达系统表达 H5N1 的 HA 蛋白，加入弗氏完全佐剂制成基因工程亚单位疫苗免疫鸡和 BALB/c 小鼠，结果显示对同一亚型的禽流感病毒攻击，SPF 鸡和商品鸡均产生了完全保护；免疫 BALB/c 小鼠也抵抗了同一亚型禽流感病毒的致死性攻击。本研究通过 1.1kb 卵清蛋白启动子表达的 HA 蛋白具有良好的抗原性，免疫 SPF 鸡产生高水平、特异性的 HI 抗体，可以保护 SPF 鸡免受流感病毒的致死性攻击，为进一步构建鸡输卵管生物反应器表达保护性抗原和珍贵药物蛋白奠定了基础。

参考文献：

[1] Lillico S G, McGrew M J, Sherman A, et al. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. Drug Discov Today, 2005, 10(3):191-6.

[2] Sheridan C. FDA approves 'farmaceutical' drug from transgenic chickens. Nature Biotechnology, 2016, 34(2):117-119.

[3] Sanders M M, Mcknight G S. Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter. Biochemistry, 1988, 27(17):6550-6557.

[4] Haecker S A, Muramatsu T, Sensenbaugh K R, et al. Repression of the ovalbumin gene involves multiple negative elements including a ubiquitous transcriptional silencer. Molecular Endocrinology, 1995, 9(9):1113-1126.

[5] 杨鹏翔，王曦晨，王宇祥，等.转基因鸡生物反应器载体的构建及其表达特性分析.生物工程学报，2011,27(8):1215-1224.

Yang P X, Wang X C, Wang Y X, et al. Construction and expression characterization of transgenic chicken bioreactor vector. Chinese journal of biotechnology, 2011, 27(8):1215-1224.

[6] Oishi I, Kim S, Yoshii K, et al. Cre-LoxP-regulated expression of monoclonal antibodies driven by an ovalbumin promoter in primary oviduct cells. BMC Biotechnology, 2011, 11(1):1-8.

[7] Kodama D, Nishimiya D, Nishijima K, et al. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2012, 113(2):146-153.

[8] Liu G L, Zhang F F, Shi J Z, et al. A subunit vaccine candidate derived from a classic H5N1 avian influenza virus in China protects fowls and BALB/c mice from lethal challenge. Vaccine, 2013, 31(46):5398-5404.

[9] Meng Q W, Liu G L, Liu Y G, et al. A broad protection provided by matrix protein 2 (M2) of avian influenza virus. Vaccine, 2015, 33(31):3758-3765.

[10] Stadnicka K, Bodnar M, Marszałek A, et al. Efficient Source of Cells in Proximal Oviduct for Testing Non-Viral Expression Constructs in the Chicken Bioreactor Model and for Other in Vitro Studies. Folia Biologica, 2016,

64(1):37-46.

[11] Park H M, Okumura J, Muramatsu T, et al. Modulation of transcriptional activity of the chicken of albumin gene promoter in primary cultures of chicken oviduct cells: effects of putative regulatory elements in the 5’-flanking region. Biochem Mol Biol Int, 1995,36( 4):811-816.

[12] Palmiter R D, Sandgren E P, Avarbock M R, et al. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(2):478-482.

[13] 房浩霞，王安平，高波，等. 鸡卵清蛋白基因第一内含子和 3’-调控区对外源基因表达的调控作用. 生物工程学报，2008, 24(2):333-338.

Fang H, Wang A, Gao B, et al. The regulatory effect of the first intron and 3’-regulatory region of ovalbumin gene on transgene expression. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2):333-338.

[14] 黄菁，朱志伟，陈晓宇，等. 鸡卵清蛋白基因调控序列的克隆与载体构建. 浙江农业学报，2016,28(3):412-419.

Huang J, Zhu Z W, Chen X Y, et al. Cloning and vector construction of chicken ovalbumin gene regulatory sequences. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(3):412-419.

[15] 赵颖慧，王伟，李越，等. 1.1kb、2.7kb、3.0kb 鸡输卵管组织特异性启动子的克隆及细胞评价. 中国家禽，2014, 36(9):6-11.

Zhao Y H, Wang W, Li Y, et al.  Cloning and evaluation of 1.1 kb，2.7 kb and 3.0 kb of oviduct-specific promoter of chicken. China Poultry, 2014, 36(9):6-11.

[16] Ochiai H, Park H M, Nakamura A, et al. Synthesis of human erythropoietin in vivo in the oviduct of laying hens by localized in vivo gene transfer using electroporation. Poultry Science, 1998, 77(2):299-302.

[17] Jayapal K P, Wlaschin K F, Hu W S, et al. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting. Chemical Engineering Progress, 2007, 103(10):40-47.

[18] 逄越，李庆伟. 鸡卵清蛋白基因启动子调控 GFP 基因在鸡原代输卵管上皮细胞和中国仓鼠卵巢细胞的表达. 生物工程学报，2005, 21(1):154-158.

Pang Y, Li Q W. GFP reporter gene under the direction of chicken ovalbumin gene promoter expressed in the CHO cell and in the primary cell cultures of chicken oviduct. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(1):154-158.